DOI:10.11931/guihaia.gxzw201804004

CRISPR/Cas9 技术在非模式植物中的应用进展

白英俊 [1]，李国瑞 [2,3,4,5]，黄凤兰 [2,3,4,5]，李威 [1]，风兰 [5]，

李孟建 [5]，陈永胜 [1,2,3,4,5*]

（1. 内蒙古民族大学 农学院，内蒙古 通辽 028000；2. 内蒙古自治区高校蓖麻产业工程技术研究中心，内蒙古 通辽 028000；3. 内蒙古自治区蓖麻育种重点实验室，内蒙古 通辽 028000；4. 内蒙古自治区蓖麻产业协同创新培育中心，5. 内蒙古民族大学 生命科学学院， 内蒙古 通辽 028000）

摘要：基因组编辑技术的出现对植物遗传育种及作物性状的改良产生了深远的意义。CRISPR/Cas（clustered regularly interspaced short palindromic repeat）是由成簇规律间隔短回文重复序列及其关联蛋白组成的免疫系统。其作用是原核生物（40%细菌和 90%古细菌）用来抵抗外源遗传物质（噬菌体和病毒）的入侵。该技术实现了对基因组中多个靶基因同时进行编辑，与前两代基因编辑技术：锌指核酶（ZFNs）和转录激活因子样效应物核酶（TALENs）相比更加简单、廉价、高效。目前 CRISPR/Cas9 基因编辑技术已在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、烟草(*Nicotiana benthamiana*)、水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)、番茄（Tomato）等模式植物和多数大作物中实现了定点基因组编辑，其应用范围也不断的向各类植物扩展。但是与模式植物和一些大作物相比，CRISPR/Cas9 基因编辑技术在非模式植物，尤其在一些小作物的应用中尚存在如：载体构建、靶点设计、脱靶检测、同源重组等问题有待进一步完善。该文对 CRISPR/Cas9 技术在非模式植物与小作物研究的最新研究进展进行了总结，并讨论了该技术目前在非模式植物、小作物应用的局限性，在此基础上提出了相关改进策略。最后对 CRISPR/Cas9 系统的在非模式植物中的研究前景进行了展望，为相关科研工作者提供参考。

关键词：CRISPR/Cas9 系统，植物遗传育种，基因组编辑，非模式植物

CRISPR/Cas9 technology and its application in non-model plants

BAI Yingjun[1], LI Guorui[2,3,4,5], HUANG Fenglan[2,3,4,5], LI Wei[1], Feng Lan[5], LI Mengjian[5], CHEN Yongsheng[1,2,3,4,5*]

(1. *College of Agronomy, Inner Mongolia University for Nationalities,* 028000, Tongliao, Inner Mongolia, China; 2. *Inner Mongolia Industrial Engineering Research Center of Universities for Castor,* 028000, Tongliao, Inner Mongolia, China; 3. *Inner Mongolia Key Laboratory of Castor Breeding,* 028000, Tongliao, Inner Mongolia, China; 4. *Inner Mongolia Collaborate Innovation Cultivate Center for Castor,* 028000, Tongliao, Inner Mongolia, China; 5. *College of Life Sciences, Inner Mongolia University for Nationalities,* 028000, Tongliao, Inner Mongolia, China)

基金项目：国家自然科学基金项目(31460353)；内蒙古自治区科技创新引导资金项目(KJCX15002)；内蒙古民

族大学科研立项项目（NMDSS1757）[Supported by the Natural Science Foundation of China (31460353), Guidance fund for scientific and technological innovation (KJCX15002); Inner Mongolia University for Nationalities Scientific Research Project (NMDSS1757)]

作者简介：白英俊（1992），男（蒙古族），内蒙古通辽人， 硕士研究生，研究方向：作物栽培与耕作；E-mail: 690664676@qq.com
通讯作者：陈永胜（1971），男（蒙古族），博士，教授，博士生导师，植物生物化学与分子生物学学科带头人；E-mail: 13754059963@163.com

Abstract: The emergence of genome editing technology has far-reaching significance for plant genetic breeding and improvement of crop traits. CRISPR/Cas (clustered ordered interspaced short palindromic repeat) is a cluster of regularly spaced short palindromic repeats used by prokaryotes (40% bacteria and 90% archaea) to resist the invasion of foreign genetic material (phage and viruses). The immune system consists of its associated proteins. CRISPR acts as an RNA-based acquired immune defense system. Its spacer sequence shares homology with phage or plasmid sequences and can use target-specific RNA to direct the Cas protein to target genes that are genetically incorrect in almost all organisms and cells. Compared with the gene editing technology of zinc finger nuclease ZFN and transcriptional activator-like effector ribozyme TALEN, it has the advantages of being flexible, efficient, cheap, and easy to operate, rapidly surpassing the previous technology, and becoming the hottest site-specific gene editing tool. In addition, CRISPR/Cas technology has broad application prospects in functional gene screening, transcriptional regulation, epigenetic regulation, and DNA imaging. CRISPR/Cas technology is bound to change biological research methods and promote the development of biotechnology. Therefore, since its first application in 2013, it has rapidly been accepted by many Chinese and foreign researchers and applied to research, and has become a new hot spot in the field of life science research. At present, there are many cases of genomic editing reported in plants using the CRISPR/Cas9 system. The CRISPR/Cas9 gene editing technology has been successfully implemented in Arabidopsis thaliana, Nicotiana abenthamiana, Oryzasativa, Triticumaestivum, Zea mays, Tomato and other large-scale plants. The application of fixed-point genome editing also extends to various types of plants. However, CRISPR/Cas9 gene editing technology has low application in non-patterns, especially in some small crops, as compared with model species and some large crops. The problems such as

vector construction, target design, off-target detection, and homologous recombination need to be further addressed. perfect. This paper summarizes recent advances in CRISPR/Cas9 technology and research on non-model plants and small crops, and discusses the limitations of this technology in the application of non-model plants and small crops. Finally, the research prospects of the CRISPR/Cas9 system were prospected, which provided references for related researchers. It is believed that with the further development of CRISPR/Cas9 technology, these problems will eventually be overcome, and its emergence will certainly bring about better development of plant genetic engineering.

Keywords: CRISPR / Cas9 system, plant genetic breeding, genome editing, non-model plants

0 引言

遗传突变对于研究植物基因功能和作物遗传改良至关重要。在过去，自然突变体的表征已经揭示了遗传多样性的重要性。而且，许多研究已经使用了物理方法（γ辐射)，化学方法（甲磺酸乙酯）或生物方法（例如 T-DNA/转座子）导致点突变，缺失，重排和基因重组得到突变体。但随机诱变会产生许多不希望的突变，以及大规模的筛查突变体不仅工作繁琐且成本昂贵。序列特异性核酸酶（SSNs）的出现在基因定点诱变方面实现了突破。SSN 可以诱导特定的双链断裂（DSBs）染色体位点，此核酸酶可以引起的两种不同的 DNA 双链修复机制：非同源末端连接 (nonhomologousend-joining, NHEJ) 和同源重组型修复 (homology-directed repair, HDR)。锌指核酸酶（ZFNs）作为第一代 SSNs（Bibikova et al, 2002）被用于编辑植物基因组（Petolino, 2015）。然而，ZFN 结构难以操作且成本高昂，极大地阻碍了它们在各类植物当中的应用（Sanjana et al, 2012）。之后的 TALEN 的开发并在植物中应用（Boch & Bonas, 2010），虽然在载体的构建及操作上比 ZFN 更容易但是使用 TALEN 仍然需要建造复杂的串联在 TAL 蛋白中的重复结构域且成本仍然很高。

CRISPR 技术的问世加速了基因编辑工程的进程，突破了前两代基因编辑技术对每个靶基因确定不同的核酸酶的局限性（Sun et al, 2016; Eyquem et al, 2017; Svitashev et al, 2015）。相比与前两代基因编辑技术，CRISPR/Cas9 系统只需要对每 1 个基因靶位点修饰只需合成 1 个靶标 sgRNA (single guide RNA），实现了对基因组精确定点编辑。除此之外 CRISPR/Cas9 系统操作操作简单，花费成本低，编辑效率高等优势。目前该技术已经拟南芥、水稻、玉米（Wang et al, 2017; Kleinstiver et al, 2016）等模式植物中实现了精确的定点突变，且正在进

一步向更多的植物中实现其应用价值。

1. CRISPR/Cas9 系统的基本组成结构

一个完整的 CRISPR 序列的组件应该含有重复序列区（repeat）和间隔区（spacer）（图 1）。间隔区的功能在于外源 DNA 序列的识别与俘获（Demirci et al, 2018）短而保守的重复序列区内存在回文序列，可以形成发卡结构实现对外源基因的降解。序列的上游存在一个启动 CRISPR 的前导区（Doudna & Charpentier, 2014），破坏外源入侵基因时需要在前导区上游的 Cas 蛋白基因家族的共同作用。目前已经发现了 Cas1-Cas10 等多种类型的 Cas 基。最后 CRISPR 序列和 Cas 蛋白基因组合成一个高度保守的 CRISPR/Cas9 系统（Osakabe & Osakabe, 2015; Petolino, 2015）。

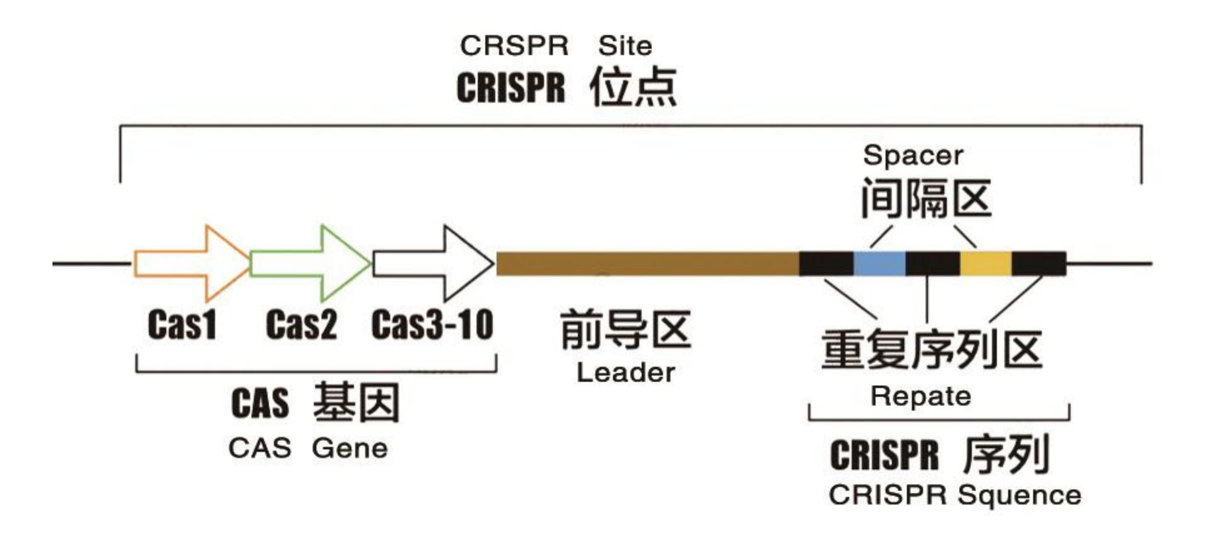


图 1 CRISPR 结构图

Fig.1 Structure diagram of CRISPR

CRISPR 系统分成 3 个类型: Type 1、Type 2、Type 3 。Type 1 型在细菌和古生菌中均有分布（Puchta & Fauser, 2014）。Type 1 型较其他两型相比组成最为复杂，不仅有多个亚型还包含了多种 Cas 蛋白，最核心蛋白元件为 Cas3 蛋白。该蛋白是一个含有多结构域的蛋白，但每个结构域都有不同的功能，其主要功能是核酸酶和解旋酶。Type 2 型其核心蛋白是含有 HNH 和 RuvC 两个核酸酶结构域的 Cas9 蛋白（Pan et al, 2016）。其中 HNH 核酸酶结构域在 CRISPR 系统中可以加工产生 crRNA,对外源基因的剪切、降解有着重要作用。目前运用最为广泛操作最为简单的就是 Type 2 型 CRISPR 系统（Lander, 2016）。Type 3 系统存在于少数细菌和古细菌，Cas6 和 Cas10 蛋白元件包含在该系统中，其主要功能是参与 crRNA 的加工和入侵 DNA 的降解。

2. CRISPR/Cas9 系统的作用机理

Type2 型 CRISPR-Cas 系统只需要三个组件，即 Cas9、RNA（tracrRNA）、CRISPRRNA（crRNA）识别和定位该系统病原体的遗传物质通过三步过程，即获得，表达和干扰（Unckless et al, 2017; Shen et al, 2013）。第一阶段俘获外源 DNA（图 2）：当噬菌体和病毒入侵时，细菌的间隔序列将俘获外源基因的一小片段 DNA 序列。外源基因与间隔序列识别的序列被称为 protosp aceradjacent Motif（PAM 位点：NGG，N 为任意碱基）。第二阶段 crRNA 的表达（图 3）：将临近 PAM 的间隔序列修饰加工并整合到自身 CRISPR 基因座中，转录为 Crispr 前体 RNA(Crispr precursorRNA，pre－crRNA)，之后进一步形成 crRNA(short CRISPR－derived RNA，crRNA)（Shen et al, 2014; Samanta et al, 2016）。第三阶段靶向干扰（图 4）：对外源基因的降解除了需要成熟的 crRNA 之外还需要一些特异性较好的小分子 RNA（tracrRNA 反式激活 RNA）的帮助。crRNA 与 tracrRNA 形成新的复合体 RNA，在与 Cas9 蛋白经 sgRNA 的引导在 PAM 位点处与外源 DNA 互补实现降解(Puchta, 2017; Xie et al, 2015）。

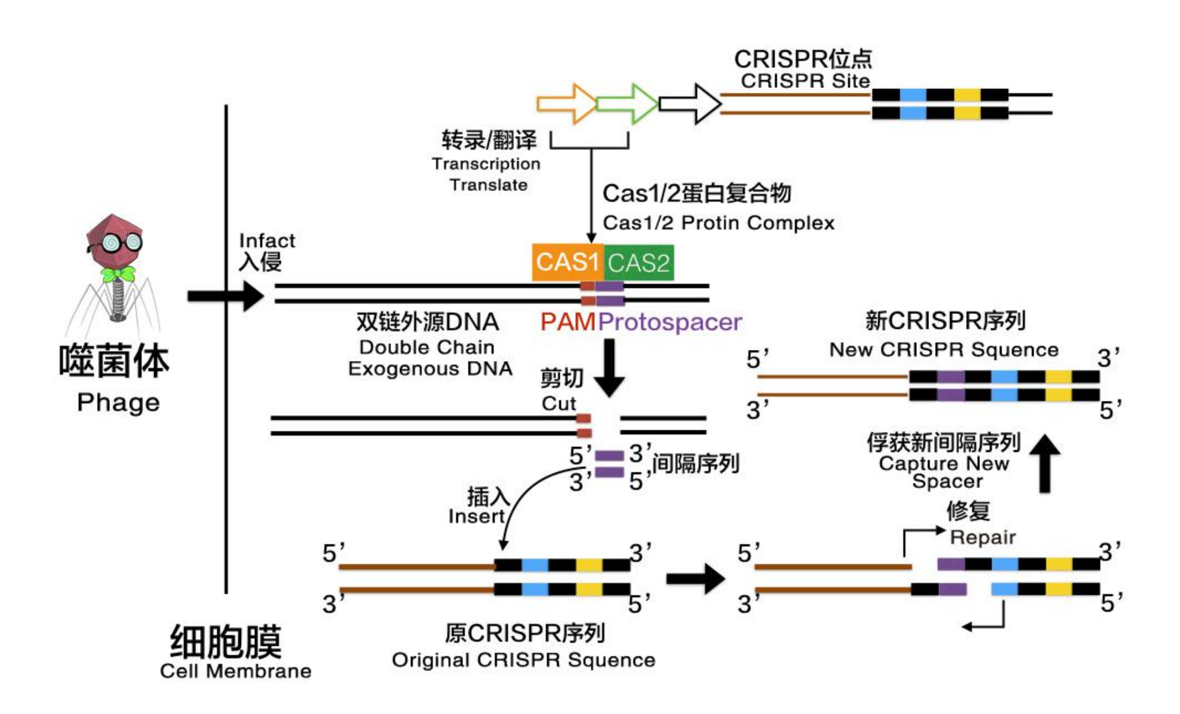


图 2 第一步： 外源基因的捕获

Fig. 2 Fiest step：Capture of foreign genes

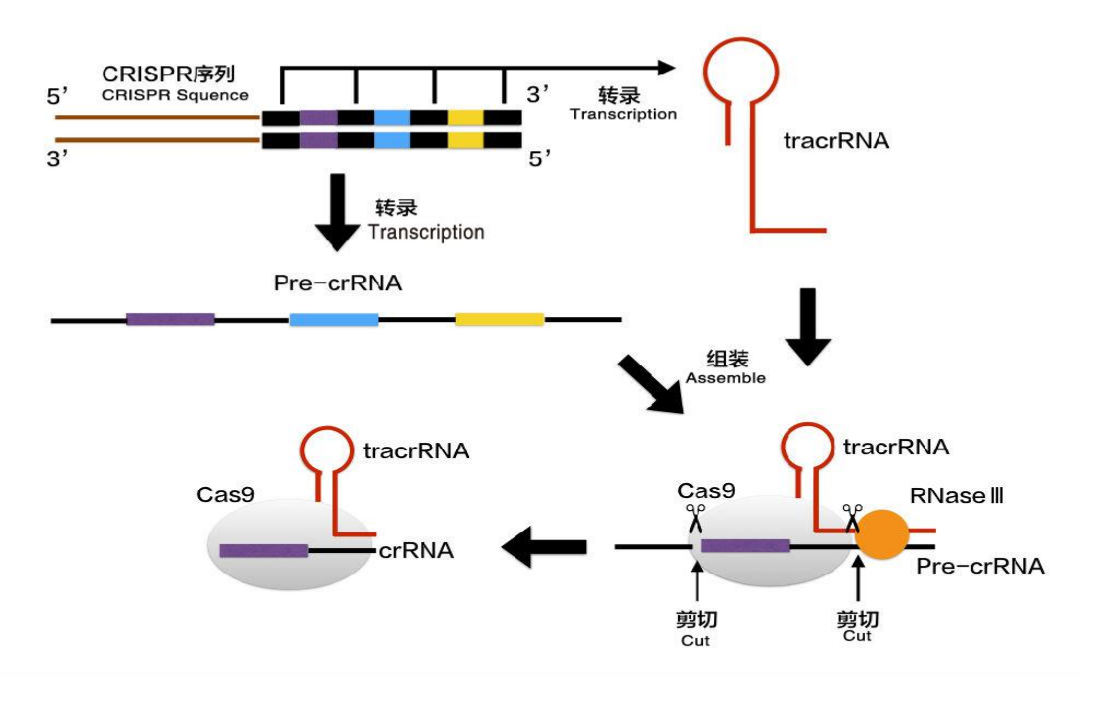


图 3 第二步： crRNA 的合成

Fig. 3 Scend step： Synthesis of crRNA

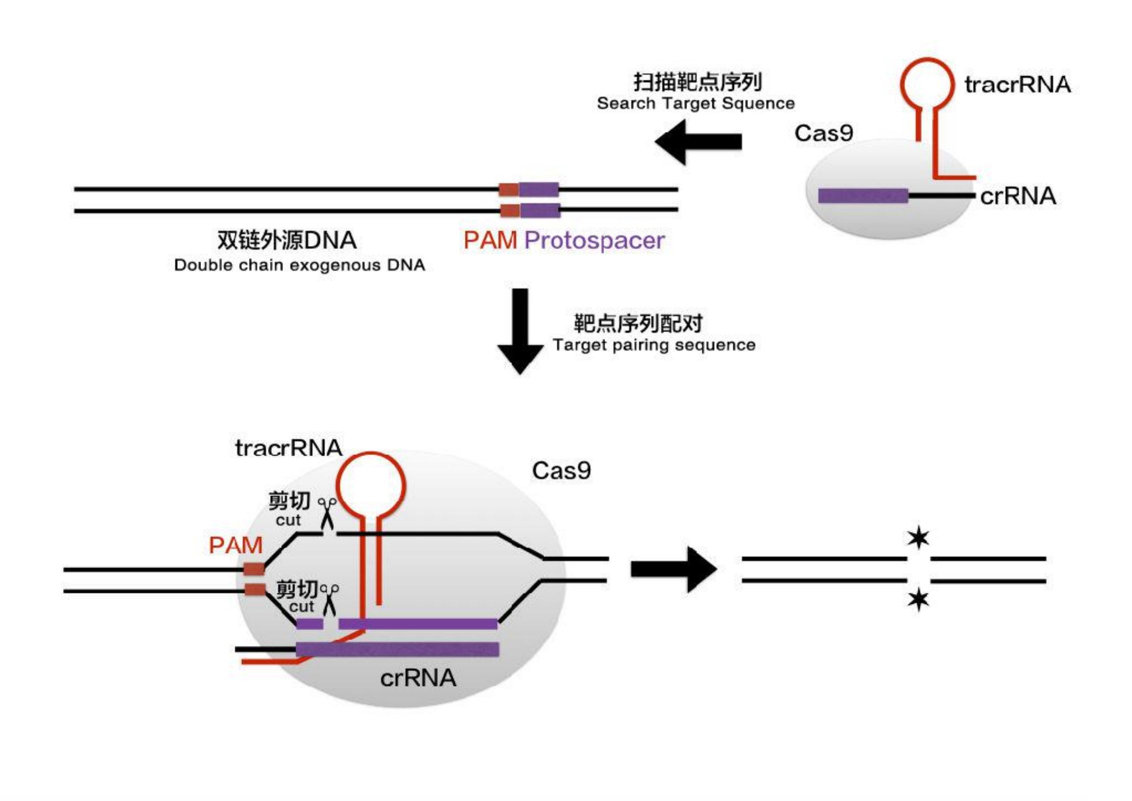


图 4 第三步： 靶向干扰

Fig. 4 Third step: Targeted interference

3.CRISPR/Cas9 系统在非模式植物、小作物当中的应用

通常情况下非模式植物是指生长周期相对较长、且基因组尚未得到透彻研究的植物。CRISPR / Cas9 基因编辑技术通过对基因的移码突变、片段删除及基因修改等功能，成为了植物遗传改良和分子设计的理想途径。CRISPR / Cas9 基因编辑技术在更多非模式植物当中的应该不仅提高了生物多样性，而且对于开发更多植物的潜力有着重要意义。该技术已经逐渐在很多非模式植物中实现了基因组定点编辑（表 1）。

3.1 糙叶山黄麻（*Parasponia*）属于榆科的热带树种，被称为唯一可以与根瘤菌建立固氮内生真菌的非豆科植物。Van 等（2018）通过使用拟南芥 AtU6 启动子驱动 sgRNA,其中 Cas9 蛋白用 35s 启动子驱动，使 CRISPR / Cas9 介导诱变 *PanHK4*，*PanEIN2*，*PanNSP1 和 PanNSP2* 四个基因，发现 P*anNSP1 和 PanNSP2* 是根瘤形成的必要条件。

3.2 杨树（*Populus*）是杨属的植物，全属有约 100 多种。杨木除了用于制作家具、造纸和火柴之外可广泛用于生态防护林、三北防护林、农林防护林和工业用材林。杨树做为道路绿化，园林景观用也是一个非常优秀的树种。Elorriaga（2016）以 pK2GW7 为 CRISPR / Cas9

基因编辑载体定点突变 *LEAFY* 与 *AGAMOUS* 基因，发现该基因为杨树诱导雄性、雌性的必要基因。

3.3 地钱(*Marchantia polymorpha*)是苔藓类植物中分布最为广泛的物种之一。Sugano 等（2014）以生长素调控因子 *ARF1* 为靶基因，用 U6-1 的启动子驱动 sgRNA，以及 35S 启动子驱动的含核定位信号的 Cas9 蛋白，实现了 CRISPR/Cas9 在地钱当中的应用。

3.4 苜蓿是苜蓿属（*Medicago*）植物的通称，俗称金花菜，是一种多年生开花植物。Meng 等（2017）以 pFGC5941 为 CRISPR/Cas9 基因编辑载体，以苜蓿 U6 启动子驱动特定 sgRNA,35s 启动子驱动 Cas9 蛋白对蒺藜苜蓿 的 *PDS* 基因进行定点敲除， 并在 T0 代得到 10.35%的纯合敲除突变体， 为苜蓿等豆科牧草的功能基因组学研究提供了新的研究工具。

3.5 百脉根（*Lotus corniculatus*）是豆科，属多年生草本植物。百脉根不仅可以作为饲料，还可以用于田地土壤的改良植物。Wang 等（2016）利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，对百脉根共生固氮 *SNF* 相关基因进行了编辑研究。

3.6 甜橙（*Citrus sinensis*）乔木，枝少刺或近于无刺。橙子中含量丰富的维生素 C、P，有着能增加机体抵抗力的作用。Jia 和 Wang（2014）以 pBI121 为 CRISPR/Cas9 基因编辑载体，靶向编辑 *CsPDS* 基因， 检测突变频率在 3.2% ～ 3.9%，为今后利用该技术进行柑橘的品种改良奠定了基础。

3.7 香蕉（*Musa* spp.）是一种重要的热带水果和粮食作物。胡春华等（2017）构建了以 *MaPDS* 为靶标基因的 pYLCRISPR/Cas9-sgRNA 载体。该载体中的 Cas9 蛋白 由 PUbi 启动子驱动，而 sgRNA 由水稻来源的 U6a 驱动，成功的获得了抗性植株。

3.8 作为全球最重要的水果作物之一，葡萄（Grape）具有巨大的经济价值。Ren 等（2016）以 *IdnDH* 为靶基因的 pCACRISPR / Cas9 二元载体。其中拟南芥 U6 启动子（AtU6）驱动 sgRNA，Cas9 蛋白基因又 35s 启动子驱动。实现了 CRISPR/Cas9 系统在葡萄当中的应该最终获得了转基因植株。

3.9 矮牵牛（*Petunia*）茄科，碧冬茄属，正式名碧冬茄，多年生草本植物。广泛用于花坛布置，花槽配置，景点摆设，窗台点缀，家庭装饰。Zhang 等（2015）以 PGGE 为载体，利用 CRISPR/Cas9 靶向编辑了类胡萝卜素生物合成中的关键酶 *PDS* 基因，成功获得了突变体植株。

表 1 CRISPR/Cas9 系统在不同非模式植物种中的应用研究

Table 1. Application of CRISPR/Cas9 System in Different Non-model Plant Species

植物名称 Plant	靶向基因 Target gene	研究年份 Time
糙叶山黄麻 *Parasponia*	*PenHK4*，*PanEIN2*，*PanNSP1*，*PanNSP2*	2017
杨树 *Populus*	*LEAFY* ，*AGAMOUS*	2016
地钱 *Marchantia polymorpha*	*ARF1*	2014
苜蓿 *Medicago*	*PDS*	2016
百脉根 *Lotus corniculatus*	*SNF*	2016
甜橙 *Citrus sinensis*	*CsPDS*	2014
香蕉 *Musa spp*	*MaPDS*	2017
葡萄 Grape	*IdnDH*	2016
矮牵牛 *Petunia*	*PDS*	2015

4.目前 CRISPR/Cas9 系统在非模式植物中的局限性

CRISPR/Cas9 系统在模式作物和一些大作物中已经得到了充分的利用，如拟南芥、玉米、水稻、小麦等。但是扩展到非模式植物尤其是一些其开发潜力巨大实用价值有待进提高的小作物，如蓖麻、荞麦、丝瓜、荠菜等等，还存在着一定的局限性。

4.1　非模式植物中 CRISPR/Cas9 载体构建问题

在进行 CRISPR/Cas9 系统的载体构建时，与非模式和小作物相比模式植物和大作物的研究较为透彻，可用其专属启动子驱动敲除载体。而大多数非模式植物尤其是小作物只能使用通用的强启动子(拟南芥 U6)来驱动 CRISPR/Cas9-sgRNA（Fauser et al, 2014; Zhang & Zhou, 2014; D'halluink & Ruiter, 2013）。经不断的研究一些科研人员构建了一套可以作为双子叶植物或单子叶作物的通用载体（Khatodia et al, 2017）。这些通用的 CRISPR/Cas9 载体只需将物种进行单双子叶的区分便可以进行基因编辑。但这些通用载体对植物的适应性及敲除效率是否优于植物的专属敲除载体，其结果有待验证。

4.2　CRISPR/Cas9 系统非模式植物中的靶点设计问题

自 CRISPR/Cas9 系统开创到应用，衍生出了包括人、动物、植物在内的在线和/或单机版共有 20 多种 sgRNA 设计软件。如：CRISPR Design、CRISPR-P 等软件（Lei et al, 2013）。按照操作平台、选择物种、输入序列、参数设置、结果输出等内容，通过制定 30 多个评测指标来确定靶基因的靶点。但是这些设计软件在智能涵盖的大多数模式植物和大的经济作物，还有很大一部分非模式植物及小作物目前没有相应的 sgRNA 设计软件。相关研究人员不得不根据常规靶点设计原则：

（1）靶点序列长度 18~22bp，一般选择 20bp；

（2）选择的靶点序列应尽量靠近起始密码子。一般为第一个或第二个外显子为最佳；

（3）选择特异性较好的靶点序列相，尽量避免重复序列、多联 A 序列，多联 T 序列；GC%含量为 40%—50%为最佳；

（4）靶点 5’端允许 1~2bp 的错配，但应保障靶点碱基匹配数不小于 18bp；

为了确保敲除位点的准确性，通过基因外显子核苷酸序列找到 PAM 位点手动设计多个 sgRNA。这为后期靶点检测确定特异性好的 sgRNA 增加了工作量。

4.3　CRISPR/Cas9 系统在非模式植物基因编辑效率与脱靶评估问题

对确定的靶点进行效率检测和脱靶评估时模式植物除了用实验方法较。如酶切法、SMART 测序法、SSA 报告载体活性检测法、Sanger 测序法等（Yang et al, 2013; Hendel et al,

2014; Yin et al, 2015）。以综合各类脱靶检测方法为基础，衍生出了定量分析基因敲除效率的相关软件，如 CRISPR-GA (CRISPR Genome Analyzer, http: //54.80.152.219/)。目前非模式植物只能通过体外转录 sgRNA 及体外酶切靶点 DNA 片段反应通过与已知活性的标准 sgRNA 靶点进行比较来评价目标 sgrna 的特异性（Cradick et al, 2014; Sun et al, 2015）。此活性测定虽然不难但是过程较为繁琐加上需做重复试验来最终确定活性较高的 sgRNA，耗时耗力。

4.4 CRISPR/Cas9 系统在非植物中重组效率问题

重组效率低是 CRISPR/Cas9 系统在模式植物和在非模式植物的通病，常规 CRISPR 使用与核酸酶（最常见的是 Cas9）偶联的指导 RNA（gRNA），其一起连接到特定的 DNA 碱基区域；然后核酸酶剪切双螺旋（Wang et al, 2015）。细胞修复机制尝试重新加入切割的 DNA 末端，但偶尔会插入或删除一些碱基，这将使 DNA 代码变成乱码，并且可能误敲除靶基因。为了修复点突变，CRISPR/Cas9 系统还必须引入具有正确碱基的“供体”DNA 链，然后依靠称为同源性定向修复（HDR）的第二种细胞机制。但是此修复模式依赖于细胞分裂状态，细胞分裂差 HDR 的作用也就很差。

4.5 CRISPR/Cas9 系统在非模式植物中遗传转化问题

利用遗传转化得到转基因植株，重点在于转化效率。目前相关研究表明转化效率与载体大小成反比。CRISPR/Cas9 基因编辑系统中，通常 Cas9 蛋白原件大于 5kb，所以遗传转化效率在一定程度会受到影响。虽然一些研究发现通过以连续转化的方式（即首先得到 hCas9 转基因植株，之后将卸载 Cas9 的小型 sgRNA 质粒转化至 hCas9 植株中）得到了与直接转化 CRISPR/Cas9 同样的突变体植株，但此方法多适用于以叶片为受体的遗传转化系统，且 hCas9 基因整合至植物基因组中有无毒害作用目前尚未可知（Lowder et al, 2015; Mikami et al, 2015）。

4.6 单碱基基因编辑系统在非模式植物中的应用问题

CRISPR/Cas9 单碱基编辑系统的应用实现了 DNA 双链不发生断裂的情况下，通过 sgRNA 靶向定位，利用胞嘧啶核苷脱氨酶进行碱基编辑（魏瑜等, 2017）。这项技术的成功纠正效率为 23-35%。目前该系统已经在模式植物中得到应用[44]。此技术的不足之处在于，该系统只能实现单个碱基 C→T 或 G→A 的编辑。单碱基编辑系统的活性窗口仍然较大。单碱基编辑系统仍然会导致靶位点产生极少量 DNA 序列插入或缺失。

5 提高 CRISPR/Cas9 系统在非模式植物中的应用效率相关策略

5.1 完善非模式植物全基因组测序

全基因组测序的目的是获得物种的基因组序列，它可以研究基因组水平上物种的生长、发育、进化和起源加深对物种的了解，并在发现新基因和改进改良育种中发挥重要作用。CRISPR/Cas9 系统用于基因组编辑研究，可以全面挖掘基因功能获得重要的遗传信息（Zhang et al, 2015）。许多非模式植物，在各种极端生境中具有广泛的生态适应性和生长能力，CRISPR/Cas9 技术的应用将促进在极端生境中生长的一些特殊性状基因的探索，如耐旱基因、耐盐基因、耐冷基因等。此外，CRISPR/Cas9 系统的应用加速了探索基因代谢途径和转录调控机制，并可以通过基因敲除和插入突变，以实现对基因的改造。

5.2 sgRNA 和 ssODNs 的设计

在 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术中，Cas9 蛋白在特定靶位点上的裂解主要是由 PAM 序列和单链 RNA(sgRNA)中的 20 nt 序列决定的。因此，sgRNA 序列的选择具有靶向性，直接决定了 Cas9 蛋白核酸酶的定位位置。首先，必须有 PAM 序列，其中 PAM 序列是 NGG(N 是任意碱基)序列。其次，为了减少切割过程中 Cas9 蛋白的缺失率，sgRNA 序列应该与基因组上的靶序列高度匹配（Cencic et al, 2014）。此外，sgRNA 与基因组其它位点的同源性最差，否则很容易导致错配。最后在设计 sgRNA 时将其长度从 20 nt 缩短到 17 nt，有助于降低错配几率。

在 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术中，sgRNA 的设计和选择非常重要。但在定点修改中，同源修复模板(ssODNS)的设计也是一个关键问题。两种不同的 DNA 修复模式(HR 和 NHEJ)在双链断裂后被诱导。两种 DNA 修复方法的区别在于 HR 需要 1 个同源修复模板，即短链 DNA，即单链寡核苷酸(ssODNs)。使用该模板的 HR 可以进行精确的点突变、插入和敲除 DNA。当在靶位点引入 1 个大片段 DNA 序列时，修复模板也可以是含有同源臂的 1 个双链质粒。近年来，ssODNs 替代了双链质粒在基因组位点修饰中的应用。为了提高修复效率，ssODN 包括和靶向序列互补的，分别沿着至少 3’方向和 5’方向延伸至少 40 nt 的序列（Ran et al, 2013）。在此基础上最好引入酶切位点，这样就可以用限制性酶切多态性实验(RFLP)，很方便的检测基因编辑系统是否有效。

5.3 Cas9 蛋白的改造

由于 CRISPR/Cas9 技术的发展,研究人员除了开发野生型 SpCas9 系统之外，还开发了新成员。在 2015 年，张峰团队发现了一种更简单的核酸酶（-Cpf1），它比 Cas9 更简单它可以单独完成 crRNA 的加工和成熟，而不依赖于核糖核酸酶(RNase)和 tracrRNA。-Cpf1 不仅可以切割 DNA 序列，而且可以作用于 RNA，并且没有脱靶现象（Kim et al, 2016）。同年，

张峰研究团队还发现了 1 个新的蛋白质 C_2C_2，仅针对细菌中特定的 RNA 序列进行切割。这些新发现可以为研究者解决未来的问题提供便利。

6 展望

CRISPR/Cas9 技术自 2013 年问世以来，已经迅速的普及到多种植物的遗传育种当中，相对于前两代 TALENs\ZFNs 的基因编辑技术而言，敲除效率高、其操作更加简便，耗材少，适用于很多实验室。在植物领域 CRISPR/Cas9 系统在基因组编辑的主要应用于模式植物和部分大作物，但要实现技术的广泛应用普及至更多的非模式植物和小作物，在未来需要进一步改进和完善。(1)特异性基因的发掘。虽然目前许多模式植物植物，尤其是大作物的全基因组测序工作已经完成。但是，很多非模式植物的基因组序列还尚未明确，许多关于重要性状的基因还有待鉴定，一定程度上阻碍了 CRSPR/Cas9 技术在植物基因工程育种中的应用；（2）载体构建效率有待提高。目前在非模式植物中，sgRNA 的设计主要通过研究人员通过植物基因外显子手动设计，且对 sgRNA 的特异性还要经过试验进一步验证确定，严重影响后期的敲除效率，在没有相关辅助软件的情况下，费时费力；(3)非模式遗传转化体系的建立。目前，还有许多非植物由于没有效遗传转化体系难以应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，加之该系统载体相对较大，对实现转化效率也有一定的影响；(4) HDR 发生频率的提高。目前 CRISPR/Cas9 技术的研究多主要是通过敲除靶位点，获得转基因植株。所以如何通过改造 CRISPR/Cas9 系统，将 HDR 在基因组靶位点引入相关功能基因，将成为 CRISPR/Cas9 技术在植物基因工程改良工作中的重点突破方向。相信随着 CRISPR/Cas9 技术的进一步发展这些问题终将被克服，它的出现必将给植物基因工程带来更好的发展。

参考文献

BIBIKOVA M, GOLIC M, GOLIC KG, et al, 2002. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases [J]. Genetics, 161(3):1169-1175.

BOCH J, BONAS U, 2010. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function [J]. Annu Rev Phytopathol, 48:419-436.

CENCIC R, MIURA H, MALINA A, et al. Protospacer adjacent motif (PAM)-distal sequences engage CRISPR Cas9 DNA target cleavage[J]. PLoS ONE, 2014, 9(10): e109213.

CRADICK TJ, ANTICO CJ, BAO G, 2014. High-throughput cellular screening of engineered nuclease activity using the single-strand annealing assay and luciferase reporter [J]. Methods Mol Biol, (1114): 339-352.

DEMIRCI Y, ZHANG B, UNVER T, 2018. CRISPR/Cas9: an RNA-guided highly precise synthetic tool for plant genome editing [J]. Cell Physiol, 233(3): 32-36.

D'HALLUIN K, RUITER R, 2013. Directed genome engineering for genome optimization [J]. Int J Dev Biol, 57(6-8): 621-627.

DOUDNA JA, CHARPENTIER E, 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. Science, 346(6213): 1258096.

Elorriaga E, 2016. Asexual Gene Drive in Populus? Results from CRISPR/Cas9 Mutagenesis of Floral Genes for Genetic Containment [C]. PAG XXVI, San Diego, CA.

EYQUEM J, MANSILLA-SOTO J, GIAVRIDIS T, et al, 2017. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection [J]. Nature, 543(7643): 113.

FAUSER F, SCHIML S, PUCHTA H, 2014. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 79(2): 348-359.

HENDEL A, KILDEBECK EJ, Fine EJ, et al, 2014. Quantifying genome-editing outcomes at endogenous loci with SMRT sequencing [J]. Cell Rep, 7(1): 293.

HU CH, DENG GM, SUN XX, et al, 2017. Establishment of an efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing system in Banana [J]. Sci Agric Sin, 50(7):1294-1301. [胡春华，邓贵明，孙晓玄，等, 2017. 香蕉 CRISPR/Cas9 基因编辑技术体系的建立 [J].中国农业科学, 50(7): 1294-1301.]

Jia H, Wang N, 2014. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. PLoS One, 2014, 9(4): e93806.

KHATODIA S, BHATOTIA K, TUTEJA N, 2017. Development of CRISPR/Cas9 mediated virus resistance in agriculturally important crops [J]. Bioengineered, 8 (3) : 274-279.

KIM D, KIM J, HUR JK, et al, 2016. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells[J]. Nat Biotechnol, 34(8): 863-868.

KLEINSTIVER BP, PATTANAYAK V, PREW MS, et al, 2016. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects [J]. Nature, 529(7587): 490-495.

LANDER ES, 2016. The heroes of CRISPR [J]. Cell, 164(2): 18-28.

LEI Y, LU L, LIU HY, et al, 2014. CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants [J]. Mol Plant, 7(9): 1494-1496.

LOWDER LG, ZHANG D, BALTES NJ, et al, 2015. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation [J]. Plant Physiol, 169(2): 971-985.

MENG Y, HOU Y, WANG H, et al, 2017. Targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 system in the model legume *Medicago truncatula* [J]. Plant Cell Rep, 36(2):371-374.

MIKAMI M, TOKI S, ENDO M, 2015. Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice [J]. Plant Mol Biol, 88 (6) : 561-572.

OSAKABE Y, OSAKABE K, 2015. Genome editing with engineered nucleases in plants [J]. Plant Cell Physiol , 56(3): 389-400.

PAN C, YE L, QIN L, et al, 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations [J]. Sci Rep, 78(6): 46916.

PETOLINO JF, 2015. Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases [J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 51(1): 1-8.

PUCHTA H, FAUSER F, 2014. Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future [J]. Plant J, 78(5): 727-741.

PUCHTA H, 2017. Applying CRISPR/Cas for genome engineering in plants: the best is yet to come [J]. Curr Opin Plant Biol, 25 (36): 1-8.

RAN FA, HSU PD, WRIGHT J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. Nat Protoc, 2013, 8(11):2281-2308.

REN C, LIU XJ, ZHANG Z, et al, 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) [J]. Sci Rep, (6): 32289.

SAMANTA MK, DEY A, GAYEN S, 2016. CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes [J]. Transgenic Res, 25 (5): 561-573.

SANJANA NE, CONG L, ZHOU Y, et al, 2012. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering [J]. Nat Protoc, 7(1):171-192.

SHEN B, ZHANG J, WU HY, et al, 2013. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting [J]. Cell Res, 23(5): 720-723.

SHEN B, ZHANG W, ZHANG J, et al, 2014. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9

nickase with minimal off-target effects [J]. Nat Methods, 11(4): 399-402.

SUGANO SS, SHIRAKAWA M, TAKAGI JT, et al, 2014. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L.[J]. Plant Cell Physiol, 55(3): 475-481.

SUN X, HU Z, CHEN R, et al, 2015. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system [J]. Sci Rep, (5): 10342.

SUN YG, ZHANG X, WU CY, et al, 2016. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase [J].Mol Plant, 9(4): 628-631.

SVITASHEV S, YOUNG JK, SCHWARTZ C, et al, 2015. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA [J]. Plant Physiol, 169(2): 931-945.

UNCKLESS RL, CLARK AG, MESSER PW, 2017. Evolution of resistance against CRISPR/Cas9 gene drive [J]. Genetics, 205(2): 827.

VAN ZEIJL A, WARDHANI TAK, SEIFI KALHOR M, et al, 2018. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of four putative symbiosis genes of the tropical tree parasponia andersonii reveals novel phenotypes [J]. Front Plant Sci, (9): 284.

WANG LX, WANG LL,TAN Q, et al, 2016. Efficient inactivation of symbiotic nitrogen fixation related genes in lotus japonicas using CRISPR-Cas9 [J]. Frontiers in Plant Sci, 7(703).

WANG MG, LU YM, BOTELLA JR, et al, 2017. Gene targeting by homology-directed repair in rice using a geminivirus-based CRISPR/Cas9 system [J].Mol Plant, 10(7): 1007-1010.

WANG S, ZHANG S, WANG W, et al, 2015. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system [J]. Plant Cell Rep, 1473-1476(9): 10342.

WEI Y, ZHANG XH, LI DL, 2017. The “new favorite” of gene editing technology-single base editors [J]. Hereditas (Beijing), 39(12):1115-1121. [魏瑜, 张晓辉, 李大力, 2017. 基因编辑之“新宠”—单碱基基因组编辑系统 [J]. 遗传, 39(12) : 1115-1121.]

XIE K, MINKENBERG B, YANG Y, 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 112(11): 3570-3575.

YANG H, WANG HY, SHIVALILA CS, et al, 2013. One-step generation of mice carrying reporter

and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. Cell, 154(6): 1370-1379.

YIN KQ, HAN T, LIU G, et al, 2015. A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing [J]. Sci Rep, 7(5): 14926.

ZHANG B, YANG X, YANG C, et al, 2016. Exploiting the CRISPR/Cas9 system for targeted genome mutagenesis in *petunia* [J]. Sci Rep, (6): 20315.

ZHANG D, LI Z, LI JF, 2016. Targeted gene manipulation in plants using the CRISPR/Cas technology[J]. J Genet Genomics, 43(5):251-262.

ZHANG L, ZHOU Q, 2014. CRISPR/Cas technology: a revolutionary approach for genome engineering [J]. Sci Chin Life Sci, 57(6): 639-640.